



吡咯喹啉醌合成及生产工艺研究进展

刘东方¹, 黄建忠¹, 陶勇², 杨欣伟^{1*}, 柯崇榕^{1,2*}

- 1 福建师范大学生命科学学院 工业微生物发酵技术国家地方联合工程研究中心 工业微生物教育部工程中心, 福建 福州 350108
- 2 中国科学院微生物研究所 微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101

刘东方, 黄建忠, 陶勇, 杨欣伟, 柯崇榕. 吡咯喹啉醌合成及生产工艺研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(4): 999-1018.

LIU Dongfang, HUANG Jianzhong, TAO Yong, YANG Xinwei, KE Chongrong. Research progress in synthesis and production technology of pyrroloquinoline quinone[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(4): 999-1018.

摘要: 吡咯喹啉醌(pyrroloquinoline quinone, PQQ)是继烟酰胺和核黄素之后发现的第三类氧化还原酶辅因子, 普遍存在于生物体中参与呼吸链电子传递, 具有促进线粒体产生、清除自由基、增强细胞代谢和预防心肌损伤等生理功能, 在医药、食品和农业领域具有广泛的应用前景。微生物发酵法是PQQ生产的主要方式, 解析PQQ生物合成途径及其调控机制, 通过代谢工程选育短周期、高产量的生产菌是PQQ工业化的研究方向之一。本文综述了PQQ的合成途径、高产菌株选育以及微生物发酵生产与分离纯化的研发工作, 为深入阐释PQQ的生物合成机制和工业化生产菌株的选育提供参考。

关键词: 吡咯喹啉醌; 合成途径; 菌株选育; 代谢调控; 分离纯化

资助项目: 国家自然科学基金(22377012, 21807011); 福建省自然科学基金面上项目(2021J01170, 2021J01172)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22377012, 21807011) and the Natural Science Foundation General Program of Fujian Province (2021J01170, 2021J01172).

*Corresponding authors. E-mail: KE Chongrong, kechr@fjnu.edu.cn; YANG Xinwei, npkace@fjnu.edu.cn

Received: 2023-10-27; Accepted: 2024-01-30; Published online: 2024-01-31

Research progress in synthesis and production technology of pyrroloquinoline quinone

LIU Dongfang¹, HUANG Jianzhong¹, TAO Yong², YANG Xinwei^{1*}, KE Chongrong^{1,2*}

¹ Engineering Research Center of Industrial Microbiology of the Ministry of Education, National and Local Joint Engineering Research Center of Industrial Microbiology and Fermentation Technology, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, Fujian, China

² CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Pyrroloquinoline quinone (PQQ), the third oxidoreductase coenzyme discovered in the nature after nicotinamide and riboflavin, is ubiquitous in bacteria, fungi, plants, and animals. PQQ participates in a variety of life activities and has anti-inflammation, anti-oxidation, cell metabolism-enhancing, and cardioprotective activities, demonstrating broad application prospects in pharmaceuticals, agriculture, food and other fields. Therefore, the large-scale production of PQQ is the primary problem that needs to be solved at present. Microbial fermentation is a primary production method of PQQ. Deciphering the biosynthesis pathway and regulatory mechanism of PQQ is essential for the screening and breeding of strains with short production periods and high yields by metabolic engineering, which has been a hot topic in this field. This paper summarizes the synthesis pathways, strain screening and breeding, microbial production, and purification processes of PQQ, aiming to provide a reference for further research and application of PQQ.

Keywords: pyrroloquinoline quinone; synthesis pathway; strain screening and breeding; metabolic regulation; isolation and purification

Hauge^[1]于 1964 年发现荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 的葡萄糖脱氢酶中存在一类新型的不同于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NAD⁺/NADP⁺)或黄素单核苷酸/黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin mononucleotide/flavin adenine dinucleotide, FMN/FAD)的辅因子, 1979 年 Salisbury 等^[2]从假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)的甲醇脱氢酶中分离出该辅因子并鉴定了其分子结构, 命名为吡咯喹啉醌(pyrroloquinoline quinone, PQQ)。PQQ 化学式为 4,5-二羰基-1-吡咯-2,3-呋啉-2,7,9-三羧酸(图 1), 含有 3 个羧基和吡咯

环等官能团, 可参与氧化还原和羰基化等生化反应, 抗氧化能力是抗坏血酸、甲萘醌等异黄酮类和多酚类化合物的 100 多倍^[3]。PQQ 在细菌和真菌中作为甲醇脱氢酶(methanol dehydrogenase,

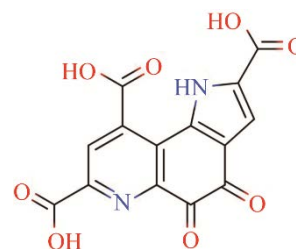


图 1 PQQ 的化学结构图

Figure 1 Chemical structure diagram of PQQ.

MDH)、葡萄糖脱氢酶(glucose dehydrogenase, GDH)和吡喃糖脱氢酶(pyranose dehydrogenase, PDH)等脱氢酶的辅因子^[4-8], 以一个较高的氧化还原电势(+90 mV)捕获醇/糖类等底物上的电子, 随后将电子传递给受体辅酶 Q 或细胞色素(B 或 C)(图 2)^[9-12], 协助脱氢酶完成特定的催化作用, 实现底物的氧化^[13]。PQQ 通过 Mg^{2+}/Ca^{2+} 介导的非共价键与酶蛋白结合, 单分子循环催化次数可高达 20 000 次^[14], 催化过程中 PQQ 获得电子形成还原态 PQQH₂, 传递电子后又恢复回氧化态 PQQ(图 2)^[11-12]。

截至目前, PQQ 作为发现的唯一存在于所有动植物组织中并参与生长发育的活性小分子, 具有促进生长、优化线粒体生物发生、清除自由基、增强细胞代谢和提高抗逆性等生理功能^[15-17]。近期研究表明, PQQ 还能在缺氧微环境中维持线粒体稳态, 保证细胞正常代谢, 缓解严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2

(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)综合征^[18]。人类自身无法合成 PQQ, 只能从食物中摄取, 芹菜、猕猴桃和纳豆等食物中 PQQ 含量较高, 其中人类母乳中 PQQ 含量高达 140–180 $\mu\text{g}/\text{L}$ ^[19-20]。因此, *Nature* 曾发表评述讨论 PQQ 是否应归类为维生素^[21]; Ames 教授于 2018 年在 *PNAS* 发文将其定义为“长寿维生素”^[22]。美国、欧盟、加拿大、日本和中国已先后批准 PQQ·Na₂ (PQQ 的商品化形式) 作为膳食补充剂或新食品原料, 中国国家农业农村部 and 药品监督管理局也先后批准 PQQ·Na₂ 作为新饲料添加剂和化妆品新原料^[23]。随着市场需求的急剧增长, 高产菌株的选育及其高效纯化工艺的开发成为 PQQ 工业化生产的首要问题。本文主要综述了 PQQ 化学合成路径、生物合成途径及其调控机制、高产菌株选育及其分离纯化等方面的研究进展, 为微生物发酵法工业化生产 PQQ 提供参考。

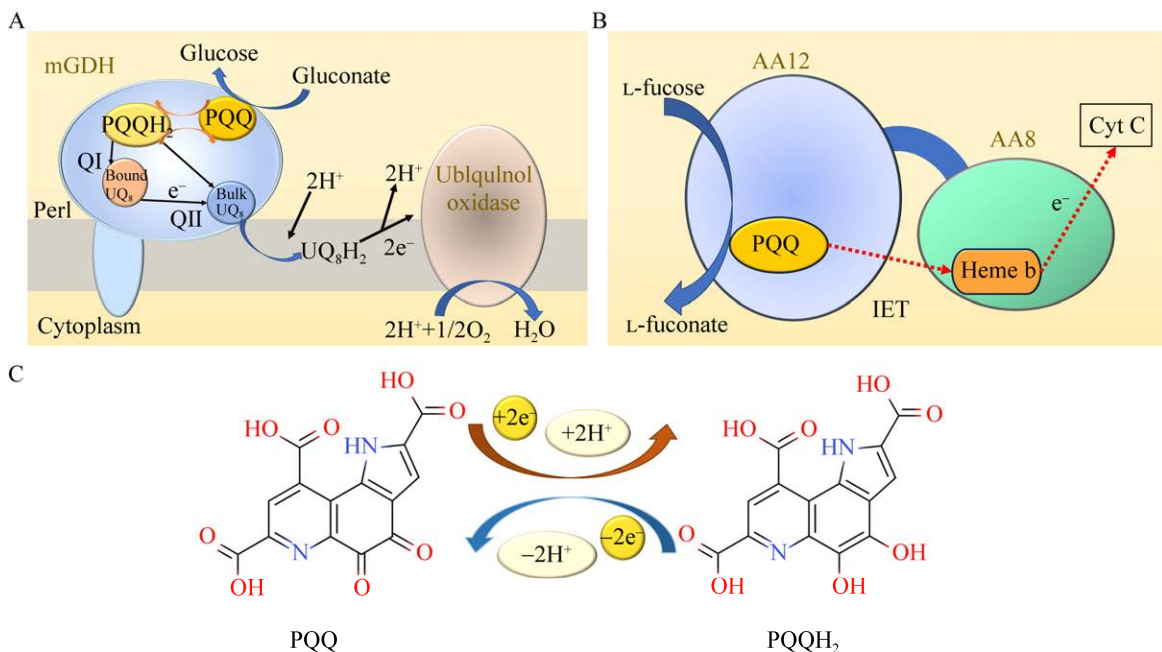


图 2 PQQ 在脱氢酶中参与电子传递^[9-12]

Figure 2 PQQ participates in electron transfer in quinone protein^[9-12]. A: PQQ transfers electrons in mGDH. B: PQQ transfers electrons in CcPDH. C: Conversion between PQQ and PQQH₂.

1 PQQ 的生理功能及应用

1.1 PQQ 维持啮齿动物和人类健康

PQQ 作为细菌和真菌中脱氢酶的辅酶,在啮齿动物和人类中具有重要的生物学功能。首先, PQQ 能够增强细胞中神经生长因子(nerve growth factor, NGF)的产生,促进皮层初级神经元的生长发育,改善动物的记忆和认知能力^[24]。Yamada 等^[25]通过被动回避实验发现腹腔注射 PQQ·Na₂ (5.0 mg/kg-BW, 7 d)的小鼠进入暗室的时间从 15 s 延长至 150 s 左右,是对照组(15 s 延长至 45 s 左右)的 3.3 倍; Tamakoshi 等^[26]对补充 PQQ·Na₂ (20 mg/d)的 20–65 周岁成年人进行了 Cognitrix 测试,发现连续 8 周补充 PQQ·Na₂ 的受试者(20–40 周岁)认知灵活性和执行速度显著提升,连续 12 周补充 PQQ·Na₂ 的受试者(41–65 周岁)复合记忆和言语记忆能力明显改善。其次, PQQ 具有很强的抗炎和抗氧化能力,能通过缓解细胞的炎症和氧化应激损伤保护机体。Wu 等^[27]发现 PQQ 处理的脓毒症大鼠(盲肠结扎穿孔手术前 1 h 腹腔注射 10 mg/kg-PQQ, 术后连续 2 周每天补充 10 mg/kg-PQQ)炎症因子白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 水平普遍降低,血清中谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的浓度降低 50%–60%,肝细胞中氧化应激标志物丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平下降 40%、谷胱甘肽(glutathione, GSH)水平上升 65%,肝细胞结节数减少,明显减轻了脓毒症引起的急性肝损伤; Harris 等^[28]在临床试验中发现补充 PQQ (0.3 mg/kg, 3 d)受试者的血浆中 C-反应蛋白(c-reactive protein, CRP)和 IL-6 水平分别下降了 45%和 30%,硫代巴比妥酸反应物(thiobarbituric

acid reactive substances, TBARS)含量显著下调。此外, PQQ 能减少机体脂肪的积累,在抗肥胖和预防肥胖及其并发症方面具有积极作用。Nakano 等^[29]在临床试验中对连续 12 周补充 PQQ·Na₂ (20 mg/d)的受试者血液进行分析,发现实验组血清中低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)的水平显著降低。最后, PQQ 还可以通过调节胞内包括作用线粒体在内的多种信号通路、调控干扰素(interferon, IFN)- γ 和 IL-4 等炎症因子、生长因子的表达发挥其提高细胞代谢、保护线粒体和保护神经等功能^[30]。上述实验结果表明, PQQ 在神经退行性疾病、机体损伤及肥胖综合征疾病领域的预防和治疗方面潜力巨大,对维持生物体正常生理功能具有重要的作用。

1.2 PQQ 提高经济动物产量

PQQ 可以提高经济动物的抗氧化能力、线粒体功能并促进生长。在牲畜饲料中添加 PQQ 可以提高其抗氧化能力,保护牲畜安全。Zhang 等^[31]在饲料中添加 1.5–7.5 mg/kg 的 PQQ·Na₂, 显著提高了妊娠期和哺乳期家猪体内超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)和过氧化氢酶(catalase, CAT)等酶的活性,提升机体的抗氧化能力。家禽饲料中额外添加 PQQ·Na₂ 可以提高禽类的线粒体活性、抗氧化能力和肉类品质。Wang 等^[32–33]在雏鸡饲料中补充 PQQ·Na₂ (0.2 mg/kg, 42 d)后,鸡的总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)提高 41.3%,料重比(feed to gain ratio, F/G)降低,胸肌平均质量增加;水产养殖中补充 PQQ 可以促进鱼类生长因子的表达,调节生长激素-胰岛素样生长因子轴(growth hormone insulin-like growth factor axis, GH/IGF),进而促进生长。Shi 等^[34]在黄颡鱼幼鱼的饲料中添加 PQQ (3–6 mg/kg)提高了幼鱼体

内生长因子如生长激素(growth hormone, GH)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)-1 和 IGF-2 等的表达量, 显著提升了黄颡鱼平均最终体重(final body weight, FBW)、增重率(weight gain rate, WGR)和特定生长率(specific growth rate, SGR)等生长参数, 降低料肉比(feed conversion ratio, FCR)。

1.3 PQQ 促产并保护经济作物

PQQ 可以增加土壤中微生物数量、提高有效磷含量和植物叶绿素含量, 从而促进植物的生长。李震等^[35]对烟草进行灌根或喷施 PQQ (200 nmol/L)的处理, 植株根鲜重和干重提升 9%以上, 最大根长、主根数等明显增多, 根系活力提高 1.4 倍以上。朱云集等^[36]对孕穗期冬小麦进行喷洒 PQQ (50 $\mu\text{mol/L}$, 3 次)的处理, 5 d 后胞内硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)和 ALT 活性上升 20%和 35%, 25 d 后叶片叶绿素含量增加 15%且光合速率上升 25%以上。PQQ 还可以预防病害及提高作物的抗逆性。病害防治方面, Li 等^[37]对水稻 Gaopin 6 号喷洒 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 PQQ, 144 h 后病害严重程度(disease severity, DS)评分 0.88, 仅为对照组的 23%; 研究发现, PQQ 促进了 *OsOSMI*、*OsAOS2*、*OsHI-LOX* 和 *OsLOX1* 基因的表达, 降低了 *OsWRKY72* 基因的表达, 显著增加了茉莉酸(jasmonic acid, JA)等抗性诱导因子的表达量, 提高了预防真菌感染的病害抗性; 抗逆方面, 何曙光等^[38]使用 0.5–1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 PQQ 喷洒处于 8 $^{\circ}\text{C}$ 低温胁迫条件下的早稻幼苗, 幼苗胞内 SOD 和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性提升了 9.19% 和 11.45%, MDA 积累显著减少, 植株耐冷能力增强, 幼苗存活率增加了 15%以上。

2 PQQ 的化学合成

PQQ 最初在 1981 年由 Gainor 等^[39]和 Corey

等^[40]分别独立通过收敛法合成。经过 40 多年的发展, 合成工艺已经从十五步法优化至目前的三步法、四步法, 产率逐渐自 2% 上升至 56%^[41]。根据底物化学结构的差异, PQQ 的化学合成法大体分为 3 类(图 3)^[42–44]。

第一类, 含有吡啶环(环 A)和吡咯环(环 C)的底物通过收敛法形成芳香环(环 B)合成 PQQ ($A+C \rightarrow ABC$)^[42,45]。Hendrickson 等^[42]以吡咯醛(1)和乌韦酮酸(2)为底物, 通过 Witting 反应得到烯烃 4 的反式异构体; 接着通过长时间的光引发的电环化反应异构为烯烃 4, 然后经过进一步环化、氧化、硝化和 Zinin 等反应生成化合物 6; 中间体 6 经过二氧化锰氧化、硝基化、加氢制胺以及重氮化等反应形成化合物 7; 最后在碱性条件下进行皂化形成 PQQ。该合成方法步骤烦琐, 且关键步骤光引发的电环化反应耗时很长, 导致单批反应需要 4 周以上, 效率低下。

第二类, 含有吡啶环或类吡啶环(同时含有环 B 和环 C)的底物通过收敛法添加环 A 合成 PQQ ($BC \rightarrow ABC$)^[43,46]。Glinkerman 等^[43]以化合物 9 为底物与 1,2,3-三嗪(8)实现反电子需求的 Diels-Alder 反应进行环加成生成 11; 中间体 11 在氧化剂——二氯二氰基苯醌(dichloro dicyano benzoquinone, DDQ)的作用下氧化脱氢生成 12, 然后通过 RuO_2 实现氧化反应生成邻醌 13, 最后对邻醌 13 的 3 个酯键进行皂化得到 PQQ。该合成法首次利用非亲核性的全氟醇催化 Diels-Alder 反应对底物进行加环, 仅需四步法即可合成 PQQ, 是目前已报道的 PQQ 化学合成法中产量最高的方法。该方法反应过程的多步反应需要氮气保护, 生产过程需要真空设备, 反应条件要求严苛。

第三类, 含有芳香环(环 B)的底物形成环 A 和环 C 两个杂环单位合成 PQQ ($B \rightarrow ABC$), 该方法中环 A 或环 C 的合成顺序不固定^[39,44,47]。

程青芳等^[44]通过 5 步法合成 PQQ 是该类方法的最便捷路径,以含有芳香环的 5-甲基-2,4-二硝基苯甲醚(**15**)为底物,在碱性条件下与草酸二乙

酯(**14**)发生缩合反应形成 **16**; **16** 在还原剂作用下发生还原反应闭环得到 **17**,然后在纯氧环境中与乙醛酸酯(**18**)和丙酮酸酯(**19**)通过 Lewis 酸

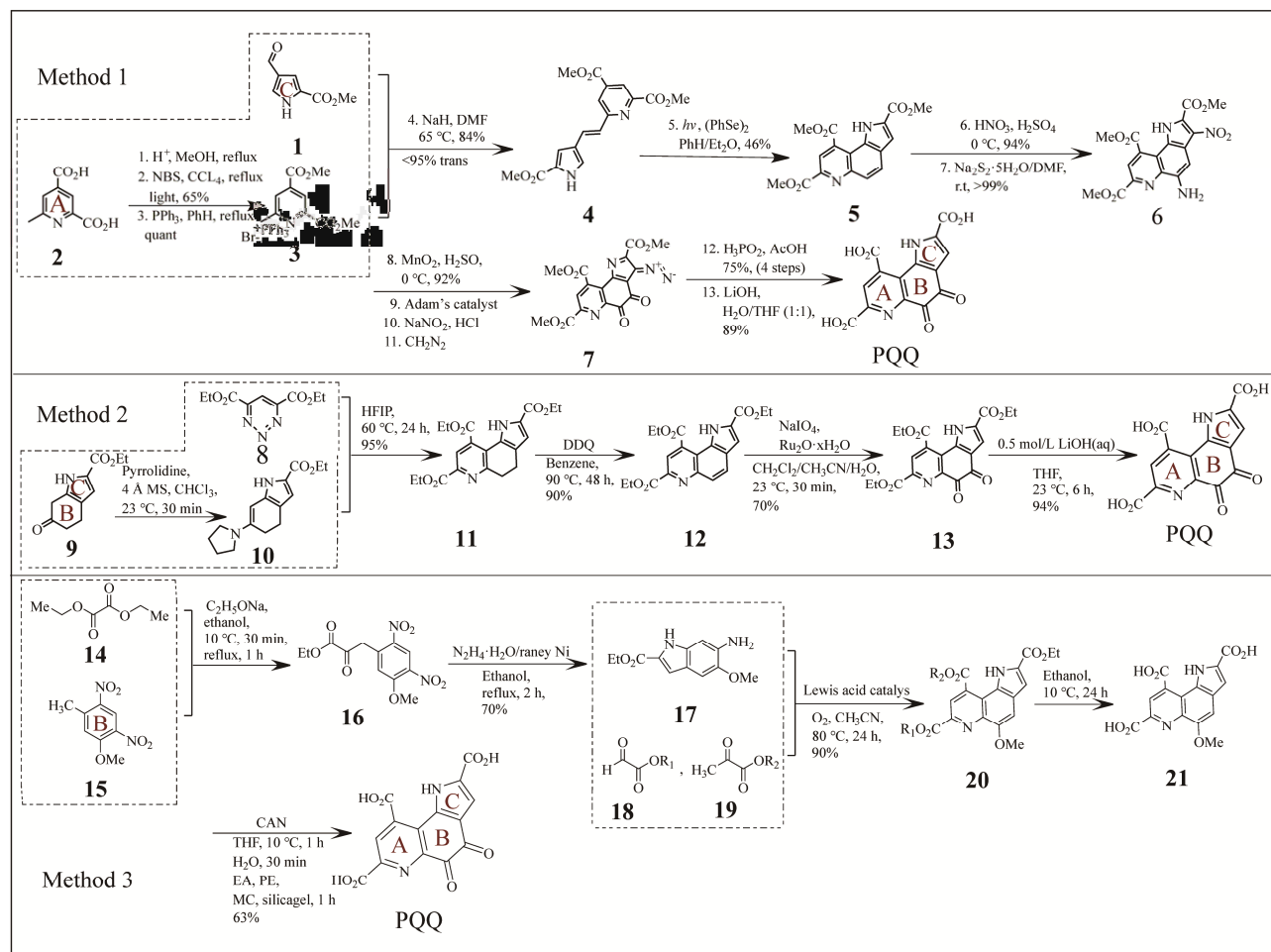


图 3 化学合成 PQQ 的三类方法^[42-44]

Figure 3 Three methods of chemical synthesis of PQQ^[42-44]. **1**: 5-ethyl-1H-pyrrole-3-carbaldehyde; **2**: 6-methylpyridine-2,4-dicarboxylic acid; **3**: Methyl 4-(methoxycarbonyl)pyridine-2-carboxylate (brominated); **4**: Methyl 6-(methoxycarbonyl)-2-[(1E)-2-[5-(methoxycarbonyl)-1H-pyrrol-3-yl]vinyl]pyridine-4-carboxylate; **5**: Methyl 2,9-bis(methoxycarbonyl)-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-7-carboxylate; **6**: Methyl 5-amino-2,9-bis(methoxycarbonyl)-3-nitro-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-7-carboxylate; **7**: Trimethyl 3-diazo-4,5-dioxo-4,5-dihydro-3H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-2,7,9-tricarboxylate; **8**: Ethyl 6-(ethoxycarbonyl)-1,2,3-triazine-4-carboxylate; **9**: Ethyl 6-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-indole-2-carboxylate; **10**: Ethyl 6-(tetrahydro-1H-pyrrol-1-yl)-4,5-dihydro-1H-indole-2-carboxylate; **11**: Ethyl 2,9-bis(ethoxycarbonyl)-4,5-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-7-carboxylate; **12**: Ethyl 2,9-bis(ethoxycarbonyl)-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-7-carboxylate; **13**: Ethyl 2,9-bis(ethoxycarbonyl)-4,5-dioxo-4,5-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-7-carboxylate; **14**: Ethyl 2-ethoxy-2-oxoacetate; **15**: 5-methoxy-1-methyl-2,4-dinitrobenzene; **16**: Ethyl 3-(5-methoxy-2,4-dinitrophenyl)-2-oxopropanoate; **17**: Ethyl 6-amino-5-methoxy-1H-indole-2-carboxylate; **18**: 2-oxidanyl-2-oxoacetaldehyde; **19**: 1-oxidanylpropane-1,2-dione; **20**: Ethyl 5-methoxy-7,9-bis(oxidanylcarbonyl)-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-2-carboxylate; **21**: 5-methoxy-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-2,7,9-tricarboxylic acid.

催化生成 **20**；最后发生酯水解反应和氧化反应得到 PQQ。该方法需要使用水合肼和浓盐酸等具有强毒性或腐蚀性的试剂，且化合物 **20** 要在纯氧环境中合成，工艺设备及工况条件要求苛刻。

目前，化学合成 PQQ 的方法总收率均较低，第一类方法收产率仅有 18%–20%，第三类方法的总收率在 39%左右，只有第二类方法总收率能够达到 56%。诸城市浩天药业有限公司生产 PQQ 采用的就是第二类化学合成法，以含有吡啶环的 6-氨基-5-甲氧基-1-吡啶-2-羧酸乙酯为底物，经过三步化学反应合成 PQQ·Na₂，其收率并未公布。化学合成法由于总收率低、反应条件苛刻、试剂昂贵且剧毒以及大量副产物产生等问题，导致生产成本低、固定资产投资大，极大地限制了化学法合成 PQQ 的工业化应用。截至 2023 年 12 月，向美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)提交评价食品添加剂的安全性指标(generally recognized as safe, GRAS)文件进行 PQQ·Na₂ 注册的 8 家企业中，只有浩天药业采用的是化学合成法。

3 PQQ 的生物合成

3.1 PQQ 生物合成的过程

PQQ 属于核糖体合成和翻译后修饰肽(ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides, RiPPs)。RiPPs 是以核糖体翻译合成的线性多肽为前体，经过系列酶催化修饰形成的结构和功能多样化天然化合物^[48]。研究人员通过基因组测序分析、基因敲除以及过表达确认只需 4–7 个基因参与 PQQ 的合成，分别命名为 *pqqA–G*^[49–50]。目前，PQQ 的合成相关基因仅在细菌中发现；Shen 等^[51]对 NCBI 中的 GenBank 数据库进行分析，发现仅有 126 株菌的基因组含有 PQQ 合成相关基因，其中仅有 6 株为革兰氏阳性细菌；120 株革兰氏阴性菌中，88%

属于变形菌门(*Proteobacteria*)，主要分布于 α -、 β -、 γ -纲，少量分布于 δ/ϵ -纲。PQQ 合成相关基因在基因组上通常以基因簇的形式存在，并且基因排列顺序相对保守^[52]。*pqq* 基因簇中，*pqqA–E* 为必需基因，*pqqF* 编码的蛋白酶 PqqF 与 *pqqL*、*pqqH*、*pqqM* 或 *tldD* 等基因编码的蛋白酶是同工酶^[53]。*pqq* 基因簇在不同细菌中的组成有所不同(图 4)，肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*) NCTC418 的 *pqq* 基因簇为 *pqqABCDEF* 单基因簇；扭脱甲基杆菌(*Methylobacterium extorquens*) AM1 则包含 *pqqABCDE* 和 *pqqFG* 两个基因簇；脱氮生丝微菌(*Hyphomicrobium denitrificans*) FJNU-6 含有 *pqqABCDE* 和 *pqqADE* 两个基因簇^[54–56]。

加州大学伯克利分校的 Zhu 等经过十几年的不懈努力下，终于在 2020 年将 PQQ 的生物合成途径基本阐释清楚^[57]。PQQ 合成的基本途径如图 5 所示，主要分为 5 步。(1) 前体肽 PqqA 是一段含有 22–39 个氨基酸残基的小肽，由 *pqqA* 基因直接转录、翻译形成；PqqA 中含有绝对保守序列 Glu-X-X-X-Tyr，其中 Glu 残基和 Tyr 残基组成 PQQ 合成的骨架^[51]。(2) PqqA 首先被伴侣蛋白 PqqD 结合形成二元复合物，防止 PqqA 被降解并形成特定的空间结构与 PqqE 结合形成三元复合物；S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)自由基酶 PqqE 催化 PqqA 中 Glu 的 C9 和 Tyr 的 C9a 缩合形成中间体 cross-linked PqqA；缩合过程需要厌氧微环境来保证反应的进行，C9–C9a 的连接需要 [4Fe–4S]⁺ 作为电子受体，[4Fe–4S]⁺ 易被氧化成 [4Fe–4S]²⁺，同时 SAM 断裂形成的脱氧腺苷自由基(deoxyadenosyl radical, dA)在有氧环境中极其不稳定^[58]。(3) Cross-linked PqqA 被蛋白酶 PqqF (或 PqqF/G 二元复合物)特异性识别，并对 Ser-Glu、Ser-Val、Ser-Tyr 和 Glu-Ser 的丝氨酸位点进行剪切，释放出 PQQ 骨

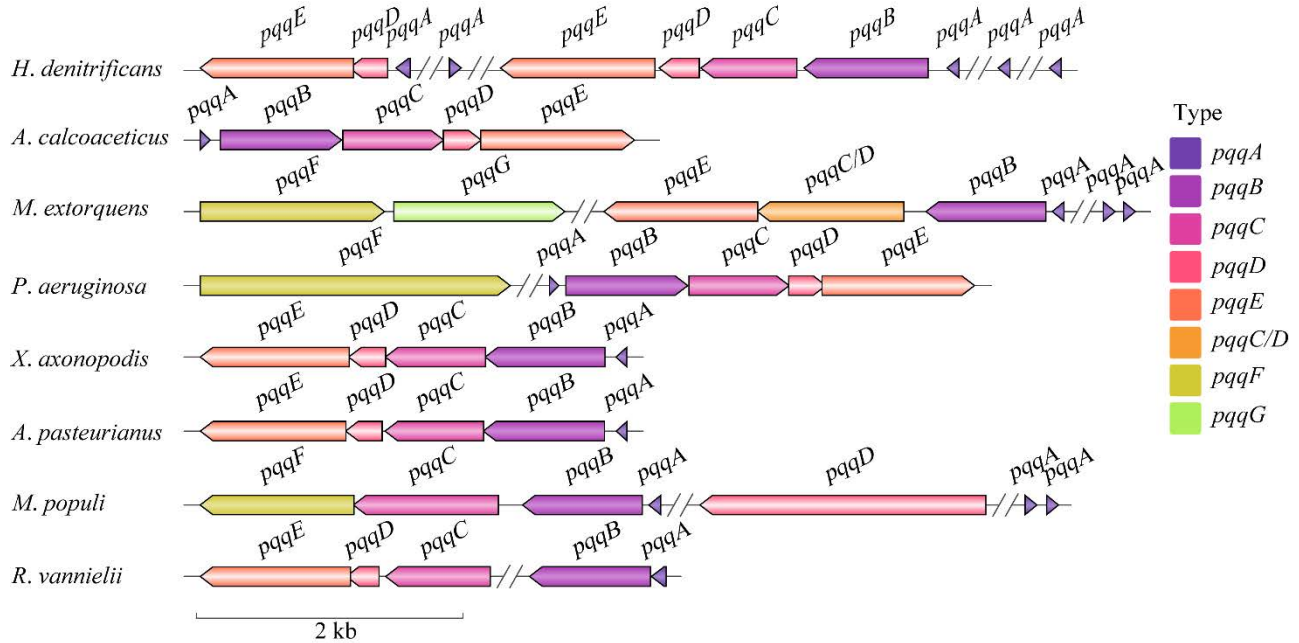


图 4 不同菌株中参与 PQQ 合成的基因

Figure 4 Genes involved in PQQ synthesis in different strains.

架 Glu-Ty^[55]。(4) 骨架 Glu-Tyr 被金属 β -内酰胺酶 PqqB 识别后进行 2 步羟基化形成 OH-Glu-DOPA；反应过程需要两分子氧参与解耦羟基化插入酪氨酸环，第一步羟基化遵循经典的氢提取 / 羟基回弹机制 (H-abstraction/hydroxyl rebound mechanism)，由 $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{-oxo}$ 辅助催化形成 Glu-DOPA；第二步羟基化由 Fe-O_2 辅助催化形成；接着，羟基化产物缩合异构为 AHQQ，AHQQ 在厌氧微环境中发生 N1-C1a 的缩合异构形成内酰胺中间体^[59]。(5) 内酰胺中间体被无辅因子加氧酶 PqqC 在有氧条件下催化发生八电子参与的多步氧化反应，形成终产物 PQQ；氧化反应过程中，步骤 A、B1、B3 共消耗 3 mol O_2 ，产生 3 mol H_2O_2 ；步骤 B2 消耗其中的 1 mol H_2O_2 ，产生 2 mol H_2O ^[60-61]。

3.2 PQQ 生物合成的调控机制

PQQ 作为一种 RiPPs，合成过程中的基因转录、翻译及产物修饰受到多种机制的调控^[48]。

Ramamoorthi 等^[62]首先在 *M. extorquens* AM1 中进行了 PQQ 合成调控机制的研究，发现 *pqqABCDE* 基因簇中 *pqqA* 和 *pqqB* 之间存在一个发夹结构；RNA 印迹 (Northern blotting) 实验显示该基因簇编码 2 个不同的转录本，即高表达的前体肽 PqqA 转录本和低表达的 PqqAB 共同转录本；当分别以甲醇和琥珀酸为碳源进行培养时，发现 PQQ 的产量相差 5 倍以上，但两种条件下转录本的转录水平没有明显差别，推测 PQQ 的合成存在一种不依赖 *pqqA* 基因转录的调控机制；*pqq* 基因簇启动子中存在 AGAAACG 序列，与甲醇脱氢酶启动子中的调控序列 AGAAATG 类似，同时敲除甲醇脱氢酶的双组分调控系统 *mxbD*、*mxbM* 和调控因子 *mxsB* 基因后发现敲除株的 PQQ 产量降低，推测这些调控蛋白可能会作用于 *pqq* 基因簇的启动子而调控 PQQ 合成。Ge 等^[63]发现在食甲基菌 (*Methylovorus* sp.) MP688 中 PQQ 的转录受到负反馈调控因子的

调节; MP688 的基因组上存在 5 个拷贝的 *pqqA* 基因, 其中 *pqqA2* 的启动子区域含有抑制子 (-300--194 bp), 敲除这段序列后 PQQ 产量提高了 2-3 倍。此外, *pqq* 基因簇转录延伸存在着转录-翻译延伸耦合调控机制, Li 等^[64]基于普通生酮基古龙酸菌 (*Ketogulonicigenium vulgare*) WSH-001 内源 I-C 型 CRISPR 系统的 *Cas3* 基因, 开发了 CRISPRE 促进转录延伸系统, 靶向识别

基因组中目的基因上的特殊原间隔序列邻近基序(protospacer adjacent motifs, PAMs)即 iPAMs, 促进 DNA 解链; *K. vulgare* WSH-001 的 *pqqABCDEF* 基因簇上 *pqqA* 与 *pqqBCDEF* 之间的基因间序列(159 bp) G+C 含量高达 64.15%, 解链受到限制; 采用 CRISPRE 促进了基因间序列解链, *pqqBCDEF* 基因转录水平从约 1 上升至约 2 (34 h), PQQ 产量最高上升 50%。

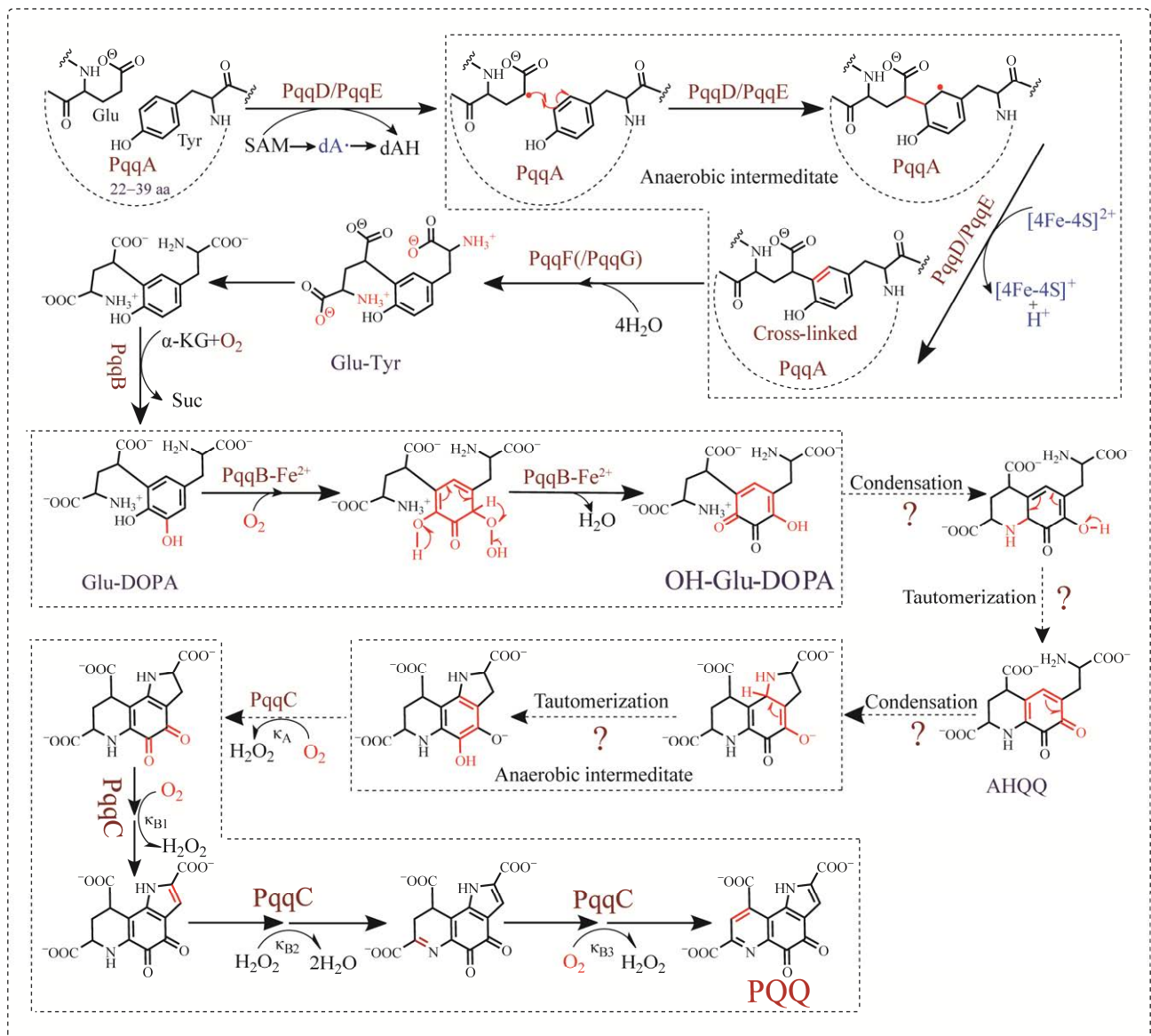


图 5 PQQ 的生物合成途径

Figure 5 Biosynthesis pathway of PQQ.

3.3 PQQ 的胞内转运及胞外摄取系统

PQQ 在细胞质中合成, 然后转运到细胞间质(细胞膜)与脱氢酶等受体结合发挥辅酶功能^[65]。Ho 等^[66]在 *M. extorquens* AM1 中发现一种可以结合 1 当量未水合的 PQQ 周质(溶质)结合蛋白, 并将该结合蛋白命名为 PqqT, 推测其可能参与 PQQ 的胞内运输。Wan 等^[67]对含有 PqqB 过表达质粒的氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) WSH-003 进行转录组分析, 发现 PQQ 产量显著提高菌株的转运蛋白 B932_1930 或 ABC 转运渗透酶 B932_2186 的转录水平, 提高了 1.77 倍或 1.67 倍, 推测上述转运蛋白参与了 PQQ 的转运。PQQ 通过 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 介导的配位键与脱氢酶相连, 结合力较弱, 主动运输到细胞间质后容易游离至胞外, 柯崇榕^[68]通过甲醇拮抗进行实验室定向驯化选育高产 PQQ 的 *H. denitrificans* FJNU-R8 时发现, 当培养体系中甲醇浓度超过 6%, 胞内 PQQ 含量超过 0.2 mg/g-DCW, 胞外含量迅速降低, 间接证实了 PQQ 是通过主动运输到达细胞间质。Hantke 等^[69]发现大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 通过主动运输和协助扩散的方式摄取 PQQ; 低浓度 (1 nmol/L) PQQ 培养体系中, 磷酸转移酶系统 (phosphotransferase system, PTS) 缺陷型 *E. coli* K-12 必须表达外膜蛋白 TonB-ExbBD 依赖转运体 PqqU 转运 PQQ, 保证菌株的快速生长(图 6); 高浓度 (≥ 33 nmol/L) PQQ 培养体系中, 亲水性的 PQQ (330 Da) 能够通过孔蛋白以扩散的方式穿过外膜进入胞内, 保证菌株的生长^[69]。

PQQ 的生物合成目前仅在细菌中被发现, 合成途径已经基本解释清楚, 只需 4-7 个基因参与。PQQ 在合成的转录起始、延伸等不同阶段受到多种机制的调控; 合成后的 PQQ 以主动运输的方式到达细胞间质, 并与脱氢酶以非共价键的形式结合; 摄取过程中则同时具有主动运输和

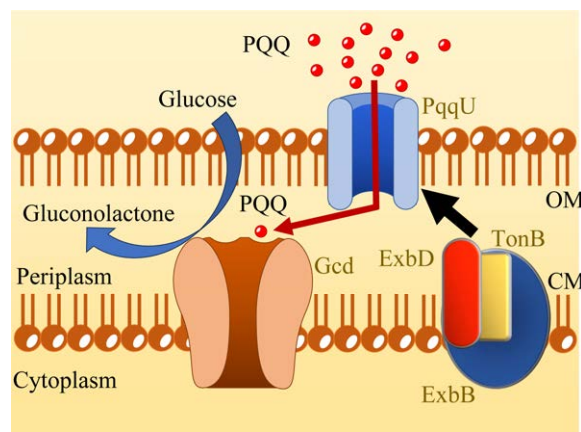


图 6 *Escherichia coli* 利用 PqqU 摄取外源的 PQQ^[69]

Figure 6 *Escherichia coli* utilizes PqqU to ingest exogenous PQQ^[69].

协助扩散两种方式。因此, 深入研究 PQQ 的合成调控、胞内转运和胞外摄取机制, 是提高 PQQ 产量的重要分子基础。

4 微生物发酵法生产 PQQ 及纯化工艺

4.1 PQQ 生产工程菌的自源改造

发酵法生产 PQQ 具有原料来源丰富、生产成本低、反应条件温和且工艺流程易控制等优点, 成为了 PQQ 工业化生产的主要方式。PQQ 工业化生产先驱 Mitsubishi Gas 公司及上市企业浙江海正药业股份有限公司和厦门金达威集团股份有限公司等 7 家企业生产 PQQ 均是采用以 *Hyphomicrobium* 为生产菌株的微生物发酵法。天然可大量产生 PQQ 的菌株主要来源于甲基杆菌属 (*Methylobacterium*)、生丝微菌属 (*Hyphomicrobium*)、副球菌属 (*Paracoccus*)、葡萄糖杆菌属 (*Gluconobacter*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 等^[70]。其中, *G. oxydans* 和 *K. pneumoniae* 因培养技术成熟且遗传操作体系较为完善, 成为 PQQ 生物合成途径研究及代谢工

程改造的常用菌株。叶润乐等^[71]通过敲除丙酮酸脱羧酶基因 *GOX1081*, 减少乙酸的形成, 并利用内源性组成型启动子 P_{0169} 融合表达 *pqqABCDE* 基因簇及 *tldD* 基因, 构建的重组菌 *G. oxydans* T2 培养 48 h, PQQ 产量提高了 20.5 倍 (3 mg/L); Mi 等^[72]利用 3 个重复 *tac* 启动子融合表达 *pqqABCDEF* 基因簇, 构建的重组菌 *K. pneumoniae* (pET-3tac-*pqq*) 培养 24 h, PQQ 产量提高了 1.4 倍 (112 mg/L)。甲基营养菌是自然条件 PQQ 产量最高的细菌, 通过代谢工程改造进一步提高产量是研究热点^[73-76]。如表 1 所示^[77-86], Lu 等^[77]构建的含 *pqqABCDE* 基因簇和 6 个 *pqqA* 基因重组质粒的工程菌甲基球状菌 (*Methylophila* sp.) YHT-1 发酵 7 d, PQQ 产量提高了 4.8 倍 (550 mg/L); 寇航等^[78]通过敲除 *hsp2* 基因优化四氢甲烷蝶呤 (tetrahydromethanopterin, H₄MPT)

途径, 构建的重组菌 *Methylophila* sp. J1-1 $\Delta hsp2$ 培养 120 h, PQQ 产量提高了 1.1 倍 (812.64 mg/L)。然而, 工业生产用的 *Hyphomicrobium* 遗传操作体系不成熟, 代谢工程改造难度大。Gak 等^[79]在专利 US201314010101 公开, 通过电转化技术将含有 *pqqABCDE* 基因簇及两个 *pqqA* 基因的质粒导入 *H. denitrificans* ATCC 51888 中, 重组菌的 PQQ 产量从 7.5 mg/L 提高到 10.6 mg/L。这是目前代谢工程改造 *H. denitrificans* 提高 PQQ 产量的唯一报道。本课题组柯崇榕^[56]前期通过接合转移技术将含有 *pqqABCDE* 基因簇的宽宿主独立复制表达质粒 pCM110 成功导入 *H. denitrificans* FJNU-6, 抗性筛选获得阳性重组株, 但重组菌 PQQ 产量没有变化; 对多株阳性菌进行质粒抽提后测序, 分析发现 pCM110 质粒不是独立存在于细胞质中, 而是随机整合到基因组

表 1 部分过表达 PQQ 的遗传操作系统

Table 1 A genetic operating system with partial overexpression of PQQ

Receptor cell	Expression systems	Donor cell	Gene cluster	Experimental system	Product (mg/L)	Source
Methylotrophs						
<i>Methylophila</i> sp. YHT-1	Single plasmid system	<i>Methylophila</i> sp. YHT-1	<i>pqqABCDE</i> , other 6 <i>pqqA</i>	3 L	550.00	[77]
<i>M. ethylophorus</i> sp. J1-1	Gene knockout	NA	$\Delta hsp2$	5 L	812.64	[78]
<i>M. extorquens</i> AM1	Single plasmid system	<i>M. extorquens</i> AM1	<i>pqqABCDE</i> <i>pqqA2A3</i>	Test tube	114.00	[79]
<i>H. denitrificans</i> 51888	Single plasmid system	<i>H. denitrificans</i> 51888	<i>pqqABCDE</i> <i>pqqA2A3</i>	Test tube	10.90	[79]
<i>M. extorquens</i> AM1	Gene mtation Single plasmid system	<i>M. extorquens</i> AM1	<i>pqqABCDE</i>	NA	7.41	[80]
Heterologous expression						
<i>E. coli</i> BL21	Single plasmid system	<i>G. oxydans</i> M5	<i>pqqABCDE</i>	Shake flask	2.00	[81]
<i>E. coli</i> W3110	CRISPR/Cas9	<i>G. oxydans</i> 621H	<i>pqqABCDE</i>	Shake flask	86.30	[82]
<i>E. coli</i> BL21	Dual plasmid system	<i>K. pneumoniae</i>	<i>pqqABCDEF</i> , <i>phoE</i>	Shake flask	199.8	[83]
<i>E. coli</i> K-12	Single plasmid system	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>pqqABCDEF</i>	NA	Very low	[84]
<i>E. coli</i> BL21	Single plasmid system	<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026	<i>pqqABCDEF</i>	Shake flask	Unexpl-ained	[85]
<i>H. seropedicae</i> Z67	Single plasmid system	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>pqqI, II, III, IV, V, L, R</i>	Test tube	0.36	[86]
<i>H. seropedicae</i> Z67	Single plasmid system	<i>P. fluorescens</i> B161	<i>pqqABCDEFHIJKM</i>	Test tube	0.85	[86]

NA means not expressed or not expressed in the original text.

上;全基因组测序分析发现,不同于模式菌株 ATCC 51888 的 II 型限制修饰系统, FJNU-6 的限制性修饰系统为 I 型限制性修饰系统,这可能是 pCM110 质粒无法以环形结构存在于细胞质的原因。

4.2 PQQ 生产工程菌的异源构建

PQQ 基因簇的异源表达是研究 PQQ 生物合成途径及其调控机制的方法之一。*E. coli* 由于其自身完善的代谢途径研究和成熟的遗传操作体系,成为异源表达系统的首选宿主^[87]。目前, PQQ 基因簇的异源表达情况如表 1 所示。Yang 等^[81]将来源于 *G. oxydans* M5 的 *pqqABCDE* 基因簇通过 pTE28a 质粒导入 *E. coli* BL21,构建的工程菌在摇瓶水平培养 60 h, PQQ 产量达到 2 mg/L。杨蒙雅等^[82]将来源于 *G. oxydans* 621H 的 *pqqABCDE* 基因簇重组至 *E. coli* PQQ-0 基因组上,通过调节各基因的拷贝数优化表达比例、敲除铁-硫簇抑制基因 *iscR* 消除铁-硫簇抑制并过表达自源 *cdh* 基因和 *ompA* 基因强化 PQQ 的胞内需求和胞外转运,最后获得工程菌 *E. coli* PQQ-17,在摇瓶水平培养 72 h, PQQ 产量达到 86.3 mg/L。王朝绚^[83]将来源于 *K. pneumoniae* 的 *pqqABCDEFG* 基因簇和 *E. coli* 内源的 *gcd* 基因分别构建质粒后导入 *E. coli* BL21,构建 PQQ 和葡萄糖耦合代谢途径,工程菌在 10 mL 体系过夜培养, PQQ 产量达到 87.52 mg/L,经培养基优化后摇瓶水平培养 12 h, PQQ 产量达到 199.8 mg/L。这是目前异源表达 PQQ 产量最高的报道,但远无法达到工业化生产的要求。这可能与 *E. coli* 细胞内组成 PQQ 骨架的谷氨酸和酪氨酸的浓度相关,酪氨酸合成属于芳香族氨基酸生物合成途径的一部分,其途径中关键限速酶的酶活或表达强度受到代谢终产物的强烈反馈抑制或阻遏^[70]。

4.3 PQQ 高效生产菌株的选育

PQQ 的生物合成调控机制尚不清晰,且甲

基营养菌的遗传操作体系不完善,通过代谢工程等手段大幅度提高菌株的 PQQ 产量存在较大的难度。因此,高产菌株的选育目前主要集中在从自然界中筛选产量较高的野生出发菌株并采用育种技术进行改造。张静等^[88]以 *H. denitrificans* CGMCC 1.12893 作为出发菌株,通过常压室温等离子体 (atmospheric and room temperature plasma, ARTP) 诱变结合高通量筛选获得一株产量提高 1.54 倍的 34 号菌株,经培养基优化后在 5 L 发酵罐培养 240 h, PQQ 产量达到 349.8 mg/L; Ren 等^[23]以 *H. denitrificans* FJNU-6 菌株作为出发菌株,通过适应性实验室定向进化 (adaptive laboratory evolution, ALE) 技术结合光谱法快速筛选体系选育获得一株产量提高 2.35 倍的高产突变株 FJNU-A26, 5 L 发酵罐中利用两阶段 pH 调控策略培养 144 h, PQQ 产量达到 1.52 g/L。微生物发酵的生产水平不仅取决于生产菌株本身的性能,而且与培养体系和培养条件息息相关。Urakami 等^[89]将 *Hyphomicrobium* sp. strain TK0441 培养体系中的 Fe^{2+} 限制在 1 mg/L, Mg^{2+} 维持在 150 mg/L, 30 L 发酵罐中培养 14 d, PQQ 产量从 167 mg/L 增加至 1 g/L; Liu 等^[90]通过两阶段供氧策略(55 h 前 60% 溶氧、55 h 后 40% 溶氧),协调菌体比生长速率和 PQQ 合成速率, *H. denitrificans* FJNU-6 在 5 L 发酵罐中培养 140 h, PQQ 产量从 0.73 g/L 提高至 1.07 g/L。 *Hyphomicrobium* 发酵产 PQQ 属于生长部分偶联型发酵,分批补料发酵稳定期短,单位细胞 PQQ 生产效率和甲醇转化率低。赵子刚等^[91]采用半连续发酵工艺在 20 L 发酵罐中培养 *Hyphomicrobium* sp. DSM 1869 连续发酵 18 d, PQQ 生产效率为每天 232.5 mg/L, 甲醇平均转化率为 8.21 g/L, 比分批补料发酵分别提高 49.8% 和 15%。

4.4 PQQ 的纯化工艺

PQQ 的发酵液中含有大量的细菌菌体、剩

余培养基成分、胞外蛋白和多糖等杂质,且 PQQ 含量不高还容易被蛋白质多肽等杂质螯合,形成不可逆的绿色复合物,造成 PQQ 含量的迅速降低。如何有效地分离是 PQQ 工业化生产急需解决的问题之一。目前开发的分离方法如表 2 所示^[92-107],马科等^[92]利用季铵盐表面活性剂与烷烃和烷醇混合制备的超分子溶剂萃取发酵液中的 PQQ,萃取液经氯化钠溶液反萃获得含 PQQ 的水相溶液,4 °C 静置 24 h 过滤即可获得纯度≥97.5%的 PQQ 红色晶体;杨雪鹏等^[93]利用三辛胺和正己烷或者离子对试剂和碳酸氢钠缓冲液萃取氧化葡萄糖杆菌发酵液 3-5 次,含有 PQQ 的有机相上层经氨水反萃 3-4 次或阴离子、减压浓缩、冷冻干燥和纯水溶解,乙醇重结晶获得纯度≥99%的 PQQ 产品。然而,由于发酵液中 PQQ 浓度较低,萃取法需要使用大量的烷烃、

烷醇等有机溶剂,提取成本高昂,操作环境要求严苛,工艺设备操作复杂。赵永芳等^[100]开发了色谱法分离纯化发酵液中的 PQQ。首先,利用亲水性 DEAE-葡聚糖凝胶色谱法吸附发酵液中 PQQ;接着,Tris-HCl 洗脱、冷冻干燥、KCl 饱和溶液溶解、低温结晶获得 PQQ 粗品;最后,粗品加水溶解后利用 C18 柱反向吸附、甲醇洗脱、冷冻干燥获得纯度≥98%的 PQQ 产品^[100]。这一方法由于葡聚糖凝胶吸附性较差且成本高昂,仅适合于实验室规模从发酵液中小试制备 PQQ。因此,Ke 等^[101]开发了操作简便、提取效率高、经济性好的大孔树脂吸附分离制备法。首先,采用微滤和超滤快速去除发酵液中的细胞碎片和多肽等大分子杂质,防止 PQQ 的螯合损失及引入新杂质;其次,利用纳滤浓缩预处理液,提高 PQQ 浓度并去除无机盐、有机酸等小分子,

表 2 发酵液中 PQQ 纯化的方法

Table 2 Purification methods of PQQ in fermentation broth

Purification method	Pureness (%)	Recycling efficiency (%)	Source
Complexation extraction method			
Supramolecular solvent complex extraction	>97.50	NA	[92]
Complex extraction	99.00	NA	[93]
Membrane filtration combination solvent extraction	>99.30	>69.00	[94]
Membrane filtration, alting out, magnetic microspheres	>99.60	78.30	[95]
Magnetic nanospheres prepared by reverse micelle method	≥97.00	≥95.60	[96]
Molecular imprinting solid phase extraction (MISPE)	>99.00	>90.00	[97]
Adsorbent combination membrane filtration	≥98.00	≥85.00	[98]
Ion pair aqueous two-phase extraction	99.00	≥85.20	[99]
Chromatography			
DEAE-sephadex with seppak C18 column	≥98.00	NA	[100]
Membrane filtration combination non polar macroporous resin	99.00	82.60	[101]
Non polar macroporous resin combination polyamide column	99.00	NA	[102]
Weak-base anion-exchange resin	98.00	NA	[103]
Sephadex chromatography combination HSCCC	93.70	53.00	[104]
Flocculant combination mixed macroporous resin	99.60	72.00	[105]
Polyamide resin combination membrane filtration	≥98.00	90.00	[106]
Non polar macroporous resin combination hydrophilic C18 silica filler	>99.50	NA	[107]

NA means not expressed in the original text.

提高树脂吸附量,简化下游纯化工艺;最后,筛选 XAD-1600 非极性大孔树脂层析吸附酸化的 PQQ 溶液,磷酸盐缓冲液洗脱,低温结晶获得纯度大于 99%,回收率 82.6%的 PQQ^[101]。此外,葛欣等^[108]通过基因敲除的手段对发酵菌株 *Methylovorus* sp. MP688 进行改造,去除了菌株合成胞外多糖的能力,减少了发酵液中多糖等代谢产物,从而简化了 PQQ 纯化工艺。

甲基营养菌是天然生产 PQQ 最多的微生物,但调控机制不清晰,遗传操作工具不成熟导致通过代谢工程改造提升 PQQ 产量的效果不理想。*E. coli* 具有完善的代谢途径研究和成熟的遗传操作体系,是理想的异源表达底盘菌,但目前构建的工程菌 PQQ 产量最高仅为 199.8 mg/L^[83]。单纯过表达 *pqq* 基因簇或相关基因不能有效提升 PQQ 产量,这可能与复杂的 PQQ 合成调控和转运机制有关。非理性设计选育高产突变株并进行培养工艺的优化是目前提高甲基营养菌 PQQ 产量的主要方式,最高产量已达到 2.35 g/L^[109]。PQQ 需要通过纯化结晶才能得到纯品,树脂层析法成本低廉、回收纯度高且体系易放大,是 PQQ 工业化生产的主要方式,但是处理使用后的树脂会产生大量污水,无害化处理较为复杂。

5 总结

PQQ 广泛分布在细菌、真菌和动植物体内,在多种疾病的研究中表现出了巨大的预防和治疗潜力,同时对经济动植物具有保护和增产作用,应用前景广阔。化学法生产 PQQ 存在总收率低、反应条件苛刻和副产物等较多痛点,逐渐被生物合成法取代。目前,利用生物合成法工业化生产 PQQ 的策略是,通过野生菌诱变育种获得 PQQ 的高产突变株,结合不同调控策略获得高 PQQ 浓度的发酵液;利用安全性高、吸附能力强、可重复使用的树脂作为层析材料对

PQQ 发酵液进行分离操作,降低纯化过程中填充剂成本和有机溶剂的使用量;获得的洗脱液经低温结晶得到纯度 99%的 PQQ 产品。PQQ 的生物合成具有原材料丰富、反应条件温和且工艺流程易操作的优势,并且其生物合成途径已基本阐明,但由于调控机制不清晰、遗传操作体系不完善,导致 PQQ 重组工程菌产量低而难以实现工业化生产。相信将来可以通过解析 PQQ 生物合成过程中的调控和转运机制、利用合成生物技术构建成熟的遗传操作系统,并结合发酵条件和分离纯化工艺优化等多种策略解决大规模生产中存在的问题,进一步提高 PQQ 产量,从而创造更好的经济效益。

参考文献

- [1] HAUGE JG. Glucose dehydrogenase of *Bacterium anitratum*: an enzyme with a novel prosthetic group[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1964, 239(11): 3630-3639.
- [2] SALISBURY SA, FORREST HS, CRUSE WBT, KENNARD O. A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenases[J]. *Nature*, 1979, 280: 843-844.
- [3] 牟京霞, 刘建民. 吡咯喹啉醌的生理功能及研究进展[J]. *当代化工研究*, 2020(10): 137-138.
MOU JX, LIU JM. Physiological function and research progress of pyrroloquinoline quinone[J]. *Modern Chemical Research*, 2020(10): 137-138 (in Chinese).
- [4] KRÜSEMANN JL, RAINALDI V, COTTON CA, CLAASSENS NJ, LINDNER SN. The cofactor challenge in synthetic methylotrophy: bioengineering and industrial applications[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2023, 82: 102953.
- [5] CHAN SI, CHUANKHAYAN P, REDDY NAREDDY PK, TSAI IK, TSAI YF, CHEN KHC, YU SSF, CHEN CJ. Mechanism of pyrroloquinoline quinone-dependent hydride transfer chemistry from spectroscopic and high-resolution X-ray structural studies of the methanol dehydrogenase from *Methylococcus capsulatus* (bath)[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(9): 3359-3372.
- [6] STINES-CHAUMEIL C, MAVRÉ F, KAUFFMANN B, MANO N, LIMOGES B. Mechanism of

- reconstitution/activation of the soluble PQQ-dependent glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: a comprehensive study[J]. ACS Omega, 2020, 5(4): 2015-2026.
- [7] MATSUMURA H, UMEZAWA K, TAKEDA K, SUGIMOTO N, ISHIDA T, SAMEJIMA M, OHNO H, YOSHIDA M, IGARASHI K, NAKAMURA N. Discovery of a eukaryotic pyrroloquinoline quinone-dependent oxidoreductase belonging to a new auxiliary activity family in the database of carbohydrate-active enzymes[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104851.
- [8] MATSUSHITA K, TOYAMA H, YAMADA M, ADACHI O. Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 58(1): 13-22.
- [9] 杨璐, 熊向华, 汪建华, 张惟材. 吡咯喹啉醌研究进展[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(6): 874-879.
YANG L, XIONG XH, WANG JH, ZHANG WC. Advances on the research of pyrroloquinoline quinone[J]. Letters in Biotechnology, 2009, 20(6): 874-879 (in Chinese).
- [10] TAKEDA K, UMEZAWA K, VÁRNAI A, EIJSINK VG, IGARASHI K, YOSHIDA M, NAKAMURA N. Fungal PQQ-dependent dehydrogenases and their potential in biocatalysis[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2019, 49: 113-121.
- [11] IKEMOTO K, MORI S, MUKAI KZ. Synthesis and crystal structure of pyrroloquinoline quinol (PQQH₂) and pyrroloquinoline quinone (PQQ)[J]. Acta Crystallographica Section B, Structural Science, Crystal Engineering and Materials, 2017, 73(Pt 3): 489-497.
- [12] DANAF NA, KRETZSCHMAR J, JAHN B, SINGER H, POL A, OP den CAMP HJM, STEUDTNER R, LAMB DC, DROBOT B, DAUMANN LJ. Studies of pyrroloquinoline quinone species in solution and in lanthanide-dependent methanol dehydrogenases[J]. Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP, 2022, 24(25): 15397-15405.
- [13] WHITAKER WB, SANDOVAL NR, BENNETT RK, FAST AG, PAPOUTSAKIS ET. Synthetic methylotrophy: engineering the production of biofuels and chemicals based on the biology of aerobic methanol utilization[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2015, 33: 165-175.
- [14] [14] STITES TE, MITCHELL AE, RUCKER RB. Physiological importance of quinoenzymes and the O-quinone family of cofactors[J]. The Journal of Nutrition, 2000, 130(4): 719-727.
- [15] XIANG X, KWAME AW, QING YL, LI S, WANG M, REN JY. Natural antioxidants inhibit oxidative stress-induced changes in the morphology and motility of cells[J]. Food Bioscience, 2023, 52: 102442.
- [16] GAO Y, KAMOGASHIRA T, FUJIMOTO C, IWASAKI S, YAMASOBA T. Pyrroloquinoline quinone (PQQ) protects mitochondrial function of HEI-OC1 cells under premature senescence[J]. NPJ Aging, 2022, 8: 3.
- [17] SHAFIQ M, LONE ZR, BHARATI P, MAHAPATRA S, RAI P, KHANDELWAL N, GAIKWAD AN, JAGAVELU K, HANIF K. Pyrroloquinoline quinone (PQQ) improves pulmonary hypertension by regulating mitochondrial and metabolic functions[J]. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics, 2022, 76: 102156.
- [18] BORETTI A. PQQ supplementation and SARS-CoV-2 spike protein-induced heart inflammation[J]. Natural Product Communications, 2022, 17(3): 1934578X221080929.
- [19] KATO C, KAWAI E, SHIMIZU N, MIKEDADO T, KIMURA F, MIYAZAWA T, NAKAGAWA K. Determination of pyrroloquinoline quinone by enzymatic and LC-MS/MS methods to clarify its levels in foods[J]. PLoS One, 2018, 13(12): e0209700.
- [20] MITCHELL AE, JONES AD, MERCER RS, RUCKER RB. Characterization of pyrroloquinoline quinone amino acid derivatives by electrospray ionization mass spectrometry and detection in human milk[J]. Analytical Biochemistry, 1999, 269(2): 317-325.
- [21] KASAHARA T, KATO T. A new redox-cofactor vitamin for mammals[J]. Nature, 2003, 422(6934): 832.
- [22] AMES BN. Prolonging healthy aging: longevity vitamins and proteins[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(43): 10836-10844.
- [23] REN Y, YANG XW, DING LT, LIU DF, TAO Y, HUANG JZ, KE CR. Adaptive evolutionary strategy coupled with an optimized biosynthesis process for the efficient production of pyrroloquinoline quinone from methanol[J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2023, 16(1): 11.
- [24] PENG Y, XU D, DING YD, ZHOU XQ. Supplementation of PQQ from pregnancy prevents MK-801-induced schizophrenia-like behaviors in mice[J]. Psychopharmacology, 2022, 239(7): 2263-2275.

- [25] YAMADA Y, NISHII K, KUWATA K, NAKAMICHI M, NAKANISHI K, SUGIMOTO A, IKEMOTO K. Effects of pyrroloquinoline quinone and imidazole pyrroloquinoline on biological activities and neural functions[J]. *Heliyon*, 2020, 6(1): e03240.
- [26] TAMAKOSHI M, SUZUKI T, NISHIHARA E, NAKAMURA S, IKEMOTO K. Pyrroloquinoline quinone disodium salt improves brain function in both younger and older adults[J]. *Food & Function*, 2023, 14(5): 2496-2501.
- [27] WU YH, ZHAO ML, LIN ZH. Pyrroloquinoline quinone (PQQ) alleviated sepsis-induced acute liver injury, inflammation, oxidative stress and cell apoptosis by downregulating CUL3 expression[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 2459-2468.
- [28] HARRIS CB, CHOWANADISAI W, MISHCHUK DO, SATRE MA, SLUPSKY CM, RUCKER RB. Dietary pyrroloquinoline quinone (PQQ) alters indicators of inflammation and mitochondrial-related metabolism in human subjects[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2013, 24(12): 2076-2084.
- [29] NAKANO M, KAWASAKI Y, SUZUKI N, TAKARA T. Effects of pyrroloquinoline quinone disodium salt intake on the serum cholesterol levels of healthy Japanese adults[J]. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2015, 61(3): 233-240.
- [30] WEN LC, LU XY, WANG R, JIN XW, HU LQ, YOU CW. Pyrroloquinoline quinone induces chondrosarcoma cell apoptosis by increasing intracellular reactive oxygen species[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17(5): 7184-7190.
- [31] ZHANG BR, WANG CX, YANG W, ZHANG HY, MENG QW, SHI BM, SHAN AS. Transcriptome analysis of the effect of pyrroloquinoline quinone disodium (PQQ·Na₂) on reproductive performance in sows during gestation and lactation[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2019, 10(1): 62.
- [32] WANG J, ZHANG HJ, SAMUEL KG, LONG C, WU SG, YUE HY, SUN LL, QI GH. Effects of dietary pyrroloquinoline quinone disodium on growth, carcass characteristics, redox status, and mitochondria metabolism in broilers[J]. *Poultry Science*, 2015, 94(2): 215-225.
- [33] LIU GQ, SUN GM, LIAO XD, HUANG JZ, GUO MJ, ZHANG LY, GUO YL, LU L, LUO XG. Effect of dietary supplementation of pyrroloquinoline quinone disodium on growth performance, meat quality and antioxidative ability of broilers[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2020, 19(7): 1850-1856.
- [34] SHI QC, WEN ZY, WANG J, HU P, ZOU YC, WANG SQ, QIN CJ. Effects of dietary pyrroloquinoline quinone on growth performance, serum biochemical parameters, antioxidant status, and growth-related genes expressions in juvenile yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 989948.
- [35] 李震, 罗杰, 张清壮, 许石剑, 罗富方, 刘胜传, 宋莉丹, 李鑫. 吡咯喹啉醌对植烟土壤和烤烟生长的影响[J]. *湖南农业科学*, 2020(9): 14-18.
- LI Z, LUO J, ZHANG QZ, XU SJ, LUO FF, LIU SC, SONG LD, LI X. Effects of pyrroloquinoline quinone on tobacco growing soil and tobacco growth[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2020(9): 14-18 (in Chinese).
- [36] 朱云集, 王永华, 郭天财, 刘卫群, 赵永芳. 吡咯喹啉醌对冬小麦某些生理特性和穗部性状的影响(简报)[J]. *植物生理学通讯*, 2000, 36(4): 330-332.
- ZHU YJ, WANG YH, GUO TC, LIU WQ, ZHAO YF. Effects of pyrroloquinoline quinone on some physiological characteristics and panicle characters of winter wheat (brief report)[J]. *Plant Physiology Communications*, 2000, 36(4): 330-332 (in Chinese).
- [37] LI SF, TANG T, MA GL, LIU DC, PENG YJ, ZHANG YZ. Pyrroloquinoline quinone treatment induces rice resistance to sheath blight through jasmonic acid pathway[J]. *Agronomy*, 2022, 12(11): 2660.
- [38] 何曙光, 李华平, 戴力, 刘洋, 匡炜, 方宝华, 赵杨. PQQ 对低温胁迫下早稻幼苗生理特性的影响[J]. *湖南农业科学*, 2020(5): 17-20.
- HE SG, LI HP, DAI L, LIU Y, KUANG W, FANG BH, ZHAO Y. Effects of PQQ on physiological characteristics of early rice seedlings under low temperature stress[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2020(5): 17-20 (in Chinese).
- [39] GAINOR JA, WEINREB SM. Total synthesis of methoxatin, the coenzyme of methanol dehydrogenase and glucose dehydrogenase[J]. *Journal of Organic Chemistry*, 1981, 46(21): 4317-4319.
- [40] COREY EJ, TRAMONTANO A. Total synthesis of the quinonoid alcohol dehydrogenase coenzyme (1) of methylotrophic bacteria[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1981, 103(18): 5599-5600.
- [41] SCHRÖDER B, GAICH T. Methoxatin as a target in total synthesis[J]. *Synthesis*, 2017, 49(8): 1746-1756.
- [42] ENDRICKSON JB, de VRIES JG. A convergent total synthesis of methoxatin[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 1982, 47(6): 1148-1150.

- [43] GLINKERMAN CM, BOGER DL. Catalysis of heterocyclic azadiene cycloaddition reactions by solvent hydrogen bonding: concise total synthesis of methoxatin[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(38): 12408-12413.
- [44] 程青芳, 徐东强, 王伊文, 仇浩, 王启发. 一种 PQQ 的制备方法: CN114890999B[P]. 2023-10-24. CHENG QF, XU DQ, WANG YW, QIU H, WANG QF. Preparation method of PQQ: CN114890999B[P]. 2023-10-24 (in Chinese).
- [45] HENDRICKSON JB, de VRIES JG. Total synthesis of the novel coenzyme methoxatin[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 1985, 50(10): 1688-1695.
- [46] BUCHI G, BOTKIN JH, LEE GCM, YAKUSHIJIN K. A synthesis of methoxatin[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1985, 107(19): 5555-5556.
- [47] PUTHIAPARAMPIL TT, SAMBASIVAM G, GOVINDA RG, KORAMANGALA RC. Compounds of 3-(5-substituted oxy-2,4-dinitrophenyl)-2-oxo-propionic acid ester, synthesis and applications thereof: US201414218244[P]. 2015.08.25.
- [48] RUBIN GM, DING YS. Recent advances in the biosynthesis of RiPPs from multicore-containing precursor peptides[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2020, 47(9): 659-674.
- [49] VELTEROP JS, SELLINK E, MEULENBERG JJ, DAVID S, BULDER I, POSTMA PW. Synthesis of pyrroloquinoline quinone *in vivo* and *in vitro* and detection of an intermediate in the biosynthetic pathway[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(17): 5088-5098.
- [50] GOOSEN N, HORSMAN HPA, HUINEN RGM, de GROOT A, van de PUTTE P. Genes involved in the biosynthesis of PQQ from *Acinetobacter calcoaceticus*[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1989, 56(1): 85-91.
- [51] SHEN YQ, BONNOT F, IMSAND EM, RoseFIGURA JM, SJÖLANDER K, KLINMAN JP. Distribution and properties of the genes encoding the biosynthesis of the bacterial cofactor, pyrroloquinoline quinone[J]. *Biochemistry*, 2012, 51(11): 2265-2275.
- [52] OMELCHENKO MV, MAKAROVA KS, WOLF YI, ROGOZIN IB, KOONIN EV. Evolution of mosaic operons by horizontal gene transfer and gene displacement *in situ*[J]. *Genome Biology*, 2003, 4(9): R55.
- [53] LO SC, TSAI SY, CHANG WH, WU IC, SOU NL, HUNG SH W, CHIANG EP I, HUANG CC. Characterization of the pyrroloquinoline quinone producing *Rhodopseudomonas palustris* as a plant growth-promoting bacterium under photoautotrophic and photoheterotrophic culture conditions[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(18): 14080.
- [54] MEULENBERG JJM, SELLINK E, RIEGMAN NH, POSTMA PW. Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae* pqq operon [J]. *Molecular and General Genetics MGG*, 1992, 232(2): 284-295.
- [55] MARTINS AM, LATHAM JA, MARTEL PJ, BARR I, IAVARONE AT, KLINMAN JP. A two-component protease in *Methylorubrum extorquens* with high activity toward the peptide precursor of the redox cofactor pyrroloquinoline quinone[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(41): 15025-15036.
- [56] 柯崇榕. 吡咯喹啉醌的高产菌株选育、发酵制备及生物合成途径的研究[D]. 福州: 福建师范大学博士学位论文, 2016. KE CR. Breeding, preparation and biosynthetic pathway analysis of pyrroloquinoline quinone[D]. Fuzhou: Doctoral Dissertation of Fujian Normal University, 2016 (in Chinese).
- [57] ZHU W, KLINMAN JP. Biogenesis of the peptide-derived redox cofactor pyrroloquinoline quinone[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2020, 59: 93-103.
- [58] LATHAM JA, IAVARONE AT, BARR I, JUTHANI PV, KLINMAN JP. PqqD is a novel peptide chaperone that forms a ternary complex with the radical S-adenosylmethionine protein PqqE in the pyrroloquinoline quinone biosynthetic pathway[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(20): 12908-12918.
- [59] LIU YR, LIU YJ. Computational study of aromatic hydroxylation catalyzed by the iron-dependent hydroxylase PqqB involved in the biosynthesis of redox cofactor pyrroloquinoline quinone[J]. *Inorganic Chemistry*, 2022, 61(15): 5943-5956.
- [60] ZHU W, MARTINS AM, KLINMAN JP. Methods for expression, purification, and characterization of PqqE, a radical SAM enzyme in the PQQ biosynthetic pathway[J]. *Methods in Enzymology*, 2018, 606: 389-420.
- [61] MAGNUSSON OT, RoseFIGURA JM, TOYAMA H, SCHWARZENBACHER R, KLINMAN JP. Pyrroloquinoline quinone biogenesis: characterization

- of PqqC and its H84N and H84A active site variants[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(24): 7174-7186.
- [62] RAMAMOORTHY R, LIDSTROM ME. Transcriptional analysis of *pqqD* and study of the regulation of pyrroloquinoline quinone biosynthesis in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(1): 206-211.
- [63] GE X, WANG WX, DU BH, WANG JH, XIONG XH, ZHANG WC. Multiple *pqqA* genes respond differently to environment and one contributes dominantly to pyrroloquinoline quinone synthesis[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2015, 55(3): 312-323.
- [64] LI D, CHEN YH, HUANG F, WANG JM, LI XF, YANG Y. CRISPR: an innate transcriptional enhancer for endogenous genes in CRISPR-Cas immunity[J]. *iScience*, 2023, 26(10): 107814.
- [65] PUEHRINGER S, METLITZKY M, SCHWARZENBACHER R. The pyrroloquinoline quinone biosynthesis pathway revisited: a structural approach[J]. *BMC Biochemistry*, 2008, 9(1): 8.
- [66] HO JV, COTRUVO JA. A periplasmic binding protein for pyrroloquinoline quinone[J]. *Biochemistry*, 2019, 58(23): 2665-2669.
- [67] WAN H, XIA Y, LI JH, KANG Z, ZHOU JW. Identification of transporter proteins for PQQ-secretion pathways by transcriptomics and proteomics analysis in *Gluconobacter oxydans* WSH-003[J]. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 2017, 11(1): 72-88.
- [68] 柯崇榕. 适应性驯化选育高产吡咯喹啉醌的生丝微生物突变株[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(1): 152-161.
- KE CR. Breeding of *Hyphomicrobium denitrificans* for high production of pyrroloquinoline quinone by adaptive directed domestication[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(1): 152-161 (in Chinese).
- [69] HANTKE K, FRIZ S. The TonB-dependent uptake of pyrroloquinoline-quinone (PQQ) and secretion of gluconate by *Escherichia coli* K-12[J]. *Molecular Microbiology*, 2022, 118(4): 417-425.
- [70] 王光路, 王梦园, 周忆菲, 马科, 张帆, 杨雪鹏. 吡咯喹啉醌生物合成研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2021, 41(1): 103-113.
- WANG GL, WANG MY, ZHOU YF, MA K, ZHANG F, YANG XP. Research progress in pyrroloquinoline quinone biosynthesis[J]. *China Biotechnology*, 2021, 41(1): 103-113 (in Chinese).
- [71] 叶润乐, 李洋, 丁凡, 赵振辉, 陈晟, 袁建锋. 基于重组氧化葡萄糖酸杆菌生物合成吡咯喹啉醌[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(6): 1138-1149.
- YE RL, LI F, DING F, ZHAO ZH, CHEN S, YUAN JF. Synthesis of pyrroloquinoline quinone by recombinant *Gluconobacter oxydans*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(6): 1138-1149 (in Chinese).
- [72] MI ZW, CHENG JC, ZHAO P, TIAN PF, TAN TW. Improved production of pyrroloquinoline quinone by simultaneous augmentation of its synthesis gene expression and glucose metabolism in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(7): 1174-1183.
- [73] TOYAMA H, CHISTOSERDOVA L, LIDSTROM ME. Sequence analysis of *pqq* genes required for biosynthesis of pyrroloquinoline quinone in *Methylobacterium extorquens* AM1 and the purification of a biosynthetic intermediate[J]. *Microbiology*, 1997, 143 (Pt 2): 595-602.
- [74] van KLEEF MA, DUINE JA. Factors relevant in bacterial pyrroloquinoline quinone production[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(5): 1209-1213.
- [75] AMEYAMA M, HAYASHI M, MATSUSHITA K, SHINAGAWA E, ADACHI O. Microbial production of pyrroloquinoline quinone[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 2014, 48(2): 561-565.
- [76] MCINTIRE WS, WEYLER W. Factors affecting the production of pyrroloquinoline quinone by the *Methylotrophic bacterium* W3A1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53(9): 2183-2188.
- [77] LU WL, WU YS, NUNN D, YU O. Methods for improving pyrroloquinoline quinone production in *Methylophilum*: US2022078752[P]. 2023.05.04.
- [78] 寇航, 王艳梅, 李彤, 薄明井, 张惟材, 熊向华, 黎明. 基于 *Methylovorus* sp. J1-1 基因组尺度代谢网络优化吡咯喹啉醌合成[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(2): 173-183.
- KOU H, WANG YM, LI T, BO MJ, ZHANG WC, XIONG XH, LI M. Fermentation optimization for PQQ synthesis based on the genome-scale metabolic model of *Methylovorus* sp. J1-1[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(2): 173-183 (in Chinese).
- [79] GAK RE, GORSHKOVA NV, TOKMAKOVA IL. Method for producing pyrroloquinoline quinone using a bacterium of the genus *Methylobacterium* or *Hyphomicrobium*: US201314010101[P]. 2012.09.07.
- [80] 吴波, 赵永芳, 王银善. 吡咯喹啉醌(PQQ)合成基因对 PQQ 产量的影响[J]. *武汉大学学报(自然科学版)*, 1999(6): 869-872.
- WU B, ZHAO YF, WANG YS. The effect on production

- of PQQ directed by the pyrroloquinoline quinone biosynthesis genes' copy number[J]. Wuhan University Journal of Natural Sciences, 1999(6): 869-872 (in Chinese).
- [81] YANG XP, ZHONG GF, LIN JP, MAO DB, WEI DZ. Pyrroloquinoline quinone biosynthesis in *Escherichia coli* through expression of the *Gluconobacter oxydans* *pqqABCDE* gene cluster[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2010, 37(6): 575-580.
- [82] 杨蒙雅, 张春月, 伊进行, 王怡明, 卓明洋, 马倩, 谢希贤. 大肠杆菌中吡咯喹啉醌合成途径的构建[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(8): 75-85.
YANG MY, ZHANG CY, YI JH, WANG YM, ZHUO MY, MA Q, XIE XX. Construction of pyrroloquinoline quinone synthesis pathway in *Escherichia coli*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(8): 75-85 (in Chinese).
- [83] 王朝绚. 吡咯喹啉醌工程菌构建及关键基因研究[D]. 北京: 北京化工大学硕士学位论文, 2013.
WANG ZX. Engineering strains for production of pyrroloquinoline quinone and dissecting key genes[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing University of Chemical Technology, 2013 (in Chinese).
- [84] GOOSEN N, HORSMAN HP, HUINEN RG, van de PUTTE P. *Acinetobacter calcoaceticus* genes involved in biosynthesis of the coenzyme pyrrolo-quinoline-quinone: nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* K-12[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(1): 447-455.
- [85] SUN JG, HAN ZY, GE XZ, TIAN PF. Distinct promoters affect pyrroloquinoline quinone production in recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*[J]. Current Microbiology, 2014, 69(4): 451-456.
- [86] WAGH J, SHAH S, BHANDARI P, ARCHANA G, KUMAR GN. Heterologous expression of pyrroloquinoline quinone (*pqq*) gene cluster confers mineral phosphate solubilization ability to *Herbaspirillum seropedicae* Z67[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(11): 5117-5129.
- [87] MATSUSHITA K, ARENTS JC, BADER R, YAMADA M, ADACHI O, POSTMA PW. *Escherichia coli* is unable to produce pyrroloquinoline quinone (PQQ)[J]. Microbiology, 1997, 143 (Pt 10): 3149-3156.
- [88] 张静, 刘孟粟, 秦志杰, 曾伟主, 周景文. 吡咯喹啉醌高产菌株选育及发酵优化[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(16): 56-64.
ZHANG J, LIU MS, QIN ZJ, ZENG WZ, ZHOU JW. Breeding and fermentation optimization of high titer pyrrolo-quinoline quinone strain[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(16): 56-64 (in Chinese).
- [89] URAKAMI T, YASHIMA K, KOBAYASHI H, YOSHIDA A, ITO-YOSHIDA C. Production of pyrroloquinoline quinone by using methanol-utilizing bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(12): 3970-3976.
- [90] LIU MS, YANG XW, REN Y, XIA HP, HUANG JZ, KE CR. Two-stage oxygen supply strategy for enhancing fed-batch production of pyrroloquinoline quinone in *Hyphomicrobium denitrificans* FJNU-6[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(15): 6615-6622.
- [91] 赵子刚, 张葵. 半连续发酵工艺生产吡咯喹啉醌的方法: CN109628509B[P]. 2022-05-10.
ZHAO ZG, ZHANG K. A method for producing pyrroloquinoline quinone through semi continuous fermentation process: CN109628509B[P]. 2022-05-10.
- [92] 马科, 杨雪鹏, 史立军, 秦天苍, 钟桂芳, 徐琳, 苏筱渲, 王光路, 代军帅, 周颖, 吴贞贞, 蒋登科, 程源航. 一种利用超分子溶剂萃取法分离纯化吡咯喹啉醌的方法: CN112358478B[P]. 2021-07-23.
MA K, YANG XP, SHI LJ, QIN TC, ZHONG GF, XU L, SU XX, WANG GL, DAI JS, ZHOU Y, WU ZZ, JIANG DK, CHENG YH. Method for separating and purifying pyrroloquinoline quinone by using supramolecular solvent extraction method: CN112358478B[P]. 2021-07-23 (in Chinese).
- [93] 杨雪鹏, 马科, 钟桂芳, 胡仙妹, 叶建斌, 邵化. 络合萃取法分离纯化发酵液中的吡咯喹啉醌: CN104892597B[P]. 2016-05-04.
YANG XP, MA K, ZHONG GF, HU XM, YE JB, SHAO H. Complex extraction method for separation and purification of pyrroloquinoline quinone in fermentation broth: CN104892597B[P]. 2016-05-04 (in Chinese).
- [94] 赵燕, 张葵. 吡咯喹啉醌的分离纯化方法: CN111635402B[P]. 2021-04-30.
ZHAO Y, ZHANG K. Method for separating and purifying pyrroloquinoline quinone: CN111635402B[P]. 2021-04-30 (in Chinese).
- [95] 张茂华, 蒋永飞, 赖庆云, 赵正国, 陈亮. 基于发酵液复合盐析的吡咯喹啉醌二钠盐分离纯化方法: CN109180674A[P]. 2019-01-11.
ZHANG MH, JIANG YF, LAI QY, ZHAO ZG, CHEN

- L. Method for separating and purifying pyrroloquinoline quinone disodium salt based on fermentation liquid composite salting-out: CN109180674A[P]. 2019-01-11 (in Chinese).
- [96] 马科, 杨雪鹏, 钟桂芳, 王光路, 王冰洋, 胡仙妹, 程源航, 苏泽宇. 利用反胶束表面修饰的磁性纳米固相萃取材料分离纯化吡咯喹啉醌的方法: CN114146680A[P]. 2022-03-08.
MA K, YANG XP, ZHONG GF, WANG GL, WANG BY, HU XM, CHENG YH, SU ZY. Method for separating and purifying pyrroloquinoline quinone by using reverse micelle surface modified magnetic nano solid-phase extraction material: CN114146680A[P]. 2022-03-08 (in Chinese).
- [97] 马科, 杨雪鹏, 钟桂芳, 叶建斌, 崔君竹, 闫记. 采用分子印迹固相萃取法分离纯化发酵液中吡咯喹啉醌的方法: CN106188042B[P]. 2018-01-05.
MA K, YANG XP, ZHONG GF, YE JB, CUI JZ, YAN J. Method for separating and purifying pyrroloquinoline quinone in fermentation liquid by molecularly imprinted solid-phase extraction method: CN106188042B[P]. 2018-01-05 (in Chinese).
- [98] 孙荣, 刘建民, 任明, 张雷. 一种从发酵液中提取吡咯喹啉醌的方法: CN111440167A[P]. 2020-07-24.
SUN R, LIU JM, REN M, ZHANG L. Method for extracting pyrroloquinoline quinone from fermentation liquor: CN111440167A[P]. 2020-07-24 (in Chinese).
- [99] 马科, 杨雪鹏, 叶建斌, 钟桂芳, 汪芳芳, 闫记, 崔君竹, 胡仙妹, 邵化. 离子对双水相萃取分离吡咯喹啉醌的方法: CN105294687B[P]. 2016-11-16.
MA K, YANG XP, YE JB, ZHONG GF, WANG FF, YAN J, CUI JZ, HU XM, SHAO H. Ion pair dual water phase method for extracting and separating pyrroloquinoline quinone: CN105294687B[P]. 2016-11-16 (in Chinese).
- [100] 赵永芳, 王银善, 吴波, 成汇, 徐宁, 闵向荣. 吡咯喹啉醌的提取方法: CN1138776C[P]. 2004-02-18.
ZHAO YF, WANG YS, WU B, CHENG H, XU N, MIN XR. Extraction method of pyrroloquinoline quinone: CN1138776C[P]. 2004-02-18 (in Chinese).
- [101] KE CR, REN Y, GAO P, HAN J, TAO Y, HUANG JZ, YANG XW. Separation and purification of pyrroloquinoline quinone from fermentation broth by pretreatment coupled with macroporous resin adsorption[J]. *Separation and Purification Technology*, 2021, 257: 117962.
- [102] 杨雪鹏, 马科, 胡仙妹, 钟桂芳, 叶建斌, 刘寅, 马歌丽. 利用氧化葡萄糖杆菌生产吡咯喹啉醌的方法及应用: CN104328155B[P]. 2019-06-28.
YANG XP, MA K, HU XM, ZHONG GF, YE JB, LIU Y, MA GL. Method and application for producing pyrroloquinoline quinone by using *Gluconobacter oxydans*: CN104328155B[P]. 2019-06-28 (in Chinese).
- [103] van der MEER RA, GROEN BW, van KLEEF MA, FRANK J, JONGEJAN JA, DUINE JA. Isolation, preparation, and assay of pyrroloquinoline quinone[J]. *Methods in Enzymology*, 1990, 188: 260-283.
- [104] 梁新乐, 韩程程. 生丝微生物 LXL-PQ-409 及其应用: CN110195032B[P]. 2020-09-22.
LIANG XL, HAN CC. *Hyphomicrobium* LXL-PQ-409 and its application: CN110195032B[P]. 2020-09-22 (in Chinese).
- [105] 侯争平, 陈锋, 吉毅楠, 刘培. 一种吡咯喹啉醌的分离纯化方法: CN112194658A[P]. 2021-01-08.
HOU ZP, CHEN F, JI YN, LIU P. Method for separating and purifying pyrroloquinoline quinone: CN112194658A[P]. 2021-01-08 (in Chinese).
- [106] 何勇威, 赵燕, 张葵. 一种吡咯喹啉醌的纯化方法: CN110698472A[P]. 2020-01-17.
HE YW, ZHAO Y, ZHANG K. Purification method of pyrroloquinoline quinone: CN110698472A[P]. 2020-01-17 (in Chinese).
- [107] 柯崇榕, 黄建忠, 杨欣伟, 任洋, 魏杰, 廖灿. 一种甲基营养菌发酵液中吡咯喹啉醌的分离纯化方法及其应用: CN107056782B[P]. 2019-05-14.
KE CR, HUANG JZ, YANG XW, REN Y, WEI J, LIAO C. Separation and purification method of pyrroloquinoline quinone in methylotrophic bacteria fermentation liquor and application of method: CN107056782B[P]. 2019-05-14 (in Chinese).
- [108] 葛欣, 张惟材, 熊向华. 一种发酵生产吡咯喹啉醌过程中消除副产物多糖的方法及其应用: CN103361390B[P]. 2015-01-07.
GE X, ZHANG WC, XIONG XH. Method for eliminating side product polysaccharide in fermentation production of pyrroloquinoline quinone, and application of method: CN103361390B[P]. 2015-01-07 (in Chinese).
- [109] 陈辅辰, 张恒, 叶世豪, 陈誉民, 邹乐. 一种脱氮生丝微生物及其发酵制备吡咯喹啉醌的方法: CN115449499B[P]. 2023-03-24.
CHEN FC, ZHANG H, YE SH, CHEN YM, ZOU L. Denitrification hyphomicrobe and method for preparing pyrroloquinoline quinone by fermenting denitrification hyphomicrobe: CN115449499B[P]. 2023-03-24 (in Chinese).